

# ESTUDOS DE IRRADIAÇÃO

*Data de aceite: 03/07/2023*

### **Jackline de Paula Ayres da Silva**

Laboratório de Medicina Experimental e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ  
ORCID 0000-0003-2225-7723

### **Monique Ribeiro de Lima**

Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ  
ORCID 0009-0008-8745-9522

### **Daiani Cotrim de Paiva Campbell**

Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ  
ORCID 0000-0003-0699-204X

Hiroshima e Nagasaki. Desde então, muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de se estudar os efeitos da irradiação em diferentes órgãos, sendo o transplante de medula óssea (TMO) um dos principais alvos de estudo. O TMO consiste na infusão de células-tronco hematopoiéticas provenientes de um doador, que pode ser autólogo ou heterólogo, logo após a depleção da medula óssea doente através de tratamentos citorrredutores, tais como a quimioterapia e a radiação. O primeiro TMO clínico foi realizado em 1957, por Donnall Thomas, que administrou a seis pacientes células hematopoiéticas extraídas da medula óssea de cadáveres adultos e fetais, para o tratamento de neoplasias, em especial as hematológicas. Até os dias atuais, continua sendo o procedimento mais utilizado para o tratamento das neoplasias hematológicas, tais como leucemias e linfomas (DURAN-STRUUCK; DYSKO, 2009).

Desde a década de 1950, inúmeros biomodelos estão sendo utilizados para a pesquisa dos mecanismos envolvendo o

## **1 | USO DE MODELOS ANIMAIS EM ESTUDOS DE IRRADIAÇÃO**

Os estudos de irradiação começaram na década de 1950 devido à necessidade de tratamento às pessoas que foram atingidas pela irradiação produzida pelas bombas nucleares em

TMO, que versam desde os conceitos-chaves sobre hematopoiese, envolvendo composição dos nichos medulares, bem como os mecanismos de tolerância à rejeição ao transplante, um novo e importante campo de pesquisa que desdobrou desses estudos iniciais. Um fenômeno muito comum após a ablação das células hematopoiéticas com quimioterapia ou radioterapia, seguida da injeção de células-tronco hematopoiéticas, é a apresentação de reações sistêmicas de rejeição, chamada de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH, do inglês: *graft-versus-host disease* - GVHD) (HILL; FERRARA, 2000; COPELAN, 2006). A DECH é definida como uma resposta imune acentuada e estimulada pelo dano tecidual resultante da quimioterapia ou radioterapia pré-transplante, porém muito importante para a cura do paciente, pois níveis baixos dessa reação são importantes no reconhecimento e ativação de morte das células neoplásicas, garantindo o sucesso do TMO e cura do paciente. Essa ideia de destruição do tumor pelo próprio sistema imune foi originalmente explorada por Burnet (1970). Entretanto, reações exacerbadas causam DECH e, devido a esse tênue balanço, esse modelo virou alvo de muitos estudos em diferentes biomodelos, entre eles roedores, canídeos, lagomorfos e primatas (REKERS, 1948 e 1950; LORENZ *et al.*, 1951; OSSETROVA *et al.*, 2014).

Com relação à sensibilidade à radiação das diferentes linhagens de camundongos, BALB/C e CBA/J são as mais sensíveis, tolerando cerca de 8Gy em irradiação de dose única (*total body irradiation* – TBI) (CUI *et al.*, 2002). As linhagens murinas mais resistentes à radiação são 129/J, MA/J, SJL/J, ST/J e P/J (RODERICK, 1963; YUHAS; STORER, 1969). Entretanto, foi observado que algumas dessas linhagens sofrem influência da sazonalidade, com menor resistência à radiação durante o verão, quando a sobrevida chega a reduzir para cerca da metade do tempo esperado para o período de inverno (RODERICK, 1963). A Tabela 1 resume a taxa de sobrevivência de diferentes linhagens frente a irradiação diária de 1Gy.

Dentre as linhagens mais empregadas na experimentação animal, a C57Bl/6 e o C3H/HeN são mais tolerantes que o BALB/C, e as linhagens derivadas de cruzamentos heterólogos são ainda mais resistentes, e costumam ser muito utilizadas em modelos de DECH, como a B6D2F1, que chega a tolerar 15Gy de TBI (REDDY *et al.*, 2008). O C3H/HeN não é muito sensível à radiação de dose única, entretanto, quando irradiado com um regime de condicionamento de baixa dose fracionada, passa a ser susceptível (CUI *et al.*, 2002).

Um outro tipo de condicionamento utilizado para o TMO é a utilização de radiação fracionada, que, em comparação à radiação de dose única, induz menos lesão e parece ser mais efetiva no tratamento de tumores sólidos, enquanto a radiação de dose única parece ser mais eficaz para o tratamento de leucemias (BUCHALI *et al.*, 2000). Pesquisadores realizaram trabalhos nos quais observaram o melhor tempo de intervalo entre as irradiações durante o regime de condicionamento. Os resultados mostraram que duas doses iguais de 6Gy ou 6,5Gy, com intervalo de 4h, produziram menor mortalidade e melhor pega da medula

óssea enxertada quando comparadas ao regime de dose única, utilizando camundongos C57BL/6 e C3H/HeN. Entretanto, não foi observada diferença significativa nos TMO quando foi utilizado o regime de condicionamento de radiação de dose única de 9,5Gy ou duas doses fracionadas de 5, 5,5, 6, 6,5 ou 7Gy (KUSHIDA *et al.*, 2001; CUI *et al.*, 2002).

Outras possibilidades de regimes de condicionamento foram testadas, e resultados promissores também foram obtidos quando o fracionamento foi realizado em 3 doses de 2,5Gy durante o intervalo de 24h em camundongos BALB/c (PIERCE *et al.*, 1985). O mesmo regime de condicionamento também tem se mostrado eficaz no tratamento em humanos, e o fracionamento tem permitido a utilização de doses maiores de irradiação (8-10Gy) como forma de aumentar a sobrevivência dos pacientes e diminuir a chance de recaídas (MORGAN *et al.*, 1996; BUCHALI *et al.*, 2000).

## 2 | SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO

A irradiação possui duas principais funções antes do transplante de medula óssea (TMO): imunossupressão do organismo receptor e eliminação das células neoplásicas. Uma ação direta da irradiação é a lesão das membranas celulares e do material genético, ativando o mecanismo de morte programada. A lesão de várias células concomitantemente gera um acúmulo de debris, proteínas e moléculas que sobrecarregam os sistemas de depuração do corpo. O balanço entre a dose ideal de irradiação que mate o tumor sem gerar excesso de restos metabólicos é um limite tênue, e, por isso, há um grande esforço para se criar sistemas de monitoramento de modo a mapear, descrever e caracterizar os principais sinais decorrentes da irradiação em animais experimentais e humanos.

A síndrome aguda da irradiação (SAR) é caracterizada pela disfunção multiorgânica progressiva de dois ou mais órgãos após a exposição à radiação ionizante. Essa disfunção leva à expressão de várias sub-síndromes que acometem os diferentes órgãos de maneira e tempo dependentes, em que os principais sistemas afetados são: hematopoiético, gastrointestinal e neurovascular. As lesões no sistema gastrointestinal costumam aparecer primeiramente (2 dias), seguidas dos sintomas hematopoiéticos e neurovasculares, este último após 2 semanas, quando empregada até 4Gy em humanos. Considerando doses de radiação mais altas, a síndrome gastrointestinal e hematopoiética aparecem concomitantemente com o início dos sintomas neurovasculares, a partir de 16 horas em doses entre 6-7Gy. Acima de 12Gy, as três síndromes aparecem simultaneamente, duram cerca de 4 dias e reaparecem em 2 dias, ou seja, 6 dias após a exposição inicial à radiação (WASELENKO *et al.*, 2004).

Em camundongos, o comportamento é bem semelhante, e a presença de diarreia é um dos principais sinais gastrointestinais observados. Algumas outras lesões relatadas após a irradiação em camundongos, principalmente quando realizadas de forma fracionada, são: pneumonia intersticial idiopática, lesão gastrointestinal e formação de catarata tardia

(CUI *et al.*, 2002; NASERIAN *et al.*, 2018).

A gravidade da SAR depende da dose geral, taxa de dose, qualidade da radiação e proporção do corpo que é irradiado. A SAR geralmente progride através de 4 fases clínicas: pródromo, latência, doença e recuperação ou morte. O aumento das doses de radiação causa destruição completa da medula óssea, descamação da camada mucosa do sistema gastrointestinal, queimaduras na pele e colapso dos sistemas neurológico e cardiovascular, resultando em morte (DICARLO *et al.*, 2011)

### 3 | CONDIÇÕES IDEAIS PARA PESQUISA COM MODELO ANIMAL DE IRRADIAÇÃO

Experimentos com irradiação requerem um cuidado pré e pós-irradiação, que visam assegurar o sucesso experimental. Dessa forma, serão elencadas as condições gerais nos cuidados pré-irradiação, durante e pós-irradiação.

a. Dentre os cuidados pré-irradiação, ressaltam-se:

- Os animais devem ter seu peso e temperatura aferidos assim que chegarem ao biotério de experimentação e, assim, continuarem sendo monitorados até o início do experimento, a fim de que seja determinado o peso inicial e seja estabelecido um padrão de recuperação a ser alcançado nas semanas seguintes.
- Os animais devem ser acondicionados em gaiolas microisoladoras e ventilados individualmente, sendo utilizado filtro HEPA para filtragem do ar. A sala que abriga os animais irradiados deve ser mantida, preferencialmente, em pressão positiva relativa ao corredor, a fim de minimizar a entrada de aerossóis contendo patógenos.
- Os alimentos, água, caixa, maravalha devem ser todos esterilizados e deve-se implementar procedimentos de barreira rigorosos. Os camundongos devem ser livres de patógenos específicos (SPF – *specific pathogen free*) e ser mantidos nessas condições até o final do experimento, como forma de minimizar o risco de infecções.
- As trocas de cama das gaiolas devem ser feitas em estações de fluxo laminar ou cabines de troca, e os manipuladores devem utilizar todos os equipamentos de proteção individual (luva, touca, máscara cirúrgica) a fim de minimizar os riscos de transmissão de patógenos aos animais.
- Os camundongos devem ser tratados com antibiótico que elimine as bactérias gram negativas do trato gastrointestinal, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, a fim de evitar complicações decorrentes da irradiação, tais como infecções e ulcerações intestinais. O tratamento deve começar na semana que antecede a irradiação, permanecendo por 2 semanas após a irradiação, totalizando 3 semanas de tratamento.

O antibiótico será selecionado pelo investigador em consulta com o médico vete-

rinário do projeto. Dentre as opções de antibióticos, os empregados nesses casos para camundongos são (GOURDON; JIMENEZ, 2014):

1. Enrofloxacin 0,25 a 0,5mg/mL na água de beber.
2. Neomicina 1,1 mg/mL na água de beber.
3. Sulfametoxazol com Trimetoprima em suspensão oral, misturado com água de beber até uma concentração final de 0,65 a 1,6mg/mL (dosagem de 100 a 250mg/kg de peso vivo/24horas).

Obs: importante considerar a quantidade de água por animal. Para camundongos, é considerada a ingestão de 15mL/100g/24horas = 150mL/kg/24h.

- Alguns pesquisadores aconselham acidificar a água (pH 2,5 a 3,0) para impedir o crescimento de bactérias *gram* negativas (DURAN-STRUUCK; DYSKO, 2009).

b. Dentre os cuidados durante a irradiação, ressaltam-se:

- Imediatamente antes da irradiação, caso seja usado um irradiador de pequeno porte, é aconselhável que os animais sejam sedados, a fim de minimizar algum desconforto proveniente do irradiador, caso eles fiquem enclausurados, ou sejam rotacionados durante o processo.
- Fornecer 1ml de fluidos isotônicos estéreis (de preferência aquecidos à temperatura corporal), por via subcutânea, imediatamente antes ou após a irradiação, e repetir após 24 horas.
- Realizar analgesia com drogas de ação central para alívio de dor (exemplo, carprofeno 5mg/kg SC SID).
- Realizar cuidado de ferida na pele (pomada sulfadiaziana de prata).

c. Dentre os cuidados pós-irradiação, ressaltam-se:

- Os cuidados de acondicionamento, manipulação, hidratação e antibioticoterapia já mencionados são mantidos após a irradiação.
- A alimentação deve ser amolecida e oferecida dentro da caixa, bem como a água também poderá ser ofertada em formato gelatinizado, pois os animais ficam debilitados nos primeiros dias após o transplante e sentem dificuldade em se deslocar e de se alimentar quando rações endurecidas tradicionais são utilizadas.
- Os animais devem ser monitorados diariamente, através de ficha contendo os parâmetros para avaliação clínica e comportamental, que serão mencionados na seção a seguir. Nos primeiros 15 dias após a irradiação, é importante que o monitoramento seja feito duas vezes ao dia, devido ao grau de invasividade do procedimento de radiação e o tempo necessário para a recuperação do animal,

caso esse esteja participando de um protocolo de TMO ou DECH.

#### 4 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM MODELOS PARA IRRADIAÇÃO

O ponto final humanitário dos estudos experimentais é necessário para garantir o bem-estar animal, e vários critérios de intervenção vêm sendo utilizados como forma de minimizar o distresse, a dor e sofrimento animal. Nesse sentido, cada vez mais tem-se tentado sistematizar e quantificar elementos subjetivos como dor e sofrimento de forma a mensurar os sinais objetivos que os expressem, tais como tamanho da abertura do olho, curvatura corporal, bem como o treinamento da equipe envolvida em identificar essas alterações.

Historicamente, os modelos de irradiação usavam a DL50 (a dose na qual cinquenta por cento morrerão em trinta dias), a morte e o estado moribundo do animal como ponto final humanitário a fim de determinar a eficácia da dose em questão, mas atualmente outros critérios são considerados para a realização do ponto final humanitário antes mesmo do aparecimento de sinais de dor e desconforto do animal (NUNAMAKER *et al.*, 2013).

Uma das primeiras sugestões de monitoramento dos animais foi desenvolvida por Cooke e colaboradores (1996) e tinha como proposta o rastreamento dos seguintes parâmetros clínicos: perda de peso, postura, atividade, textura do pelo e integridade da pele. Vários outros sistemas de monitoramento foram propostos desde então, utilizando modelos experimentais em roedores, tais como estudos de distresse, câncer e da experiência adquirida na observação do comportamento de roedores após a irradiação, mas foi Nunamaker e colaboradores (2013) que aprimoraram as tabelas existentes para o modelo de irradiação e denominaram de sistema de pontuação observacional na gaiola (*Cageside Observational Scoring System*). Nessa proposta, a observação do comportamento dos animais é feita através da manutenção dos animais dentro das gaiolas sem que elas sejam abertas. Os critérios como postura, aparência dos olhos e nível de atividade foram observados e receberam uma pontuação de 0 a 3 para cada um desses critérios, sendo 0 considerado o comportamento usual/normal do animal e 3 o comportamento mais atípico.

Outra proposta de pontuação foi denominada de Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (*Mouse Intervention Scoring System - MISS*), sendo um sistema de monitoramento individual, o que torna as medidas de intervenção precoces e rápidas. Esse sistema passou por fases de aprimoramento e encontra-se na versão 3 (MISS 3), e, além de avaliar os sinais clínicos, também estabelece os critérios de prognóstico e desfecho. Esse modelo de avaliação foi a proposta mais bem-sucedida em aferir critérios clínicos que identifiquem a dor e o desconforto animal. O sistema MISS, que é o padrão ouro a ser seguido, inclui parâmetros de observação que devem ser checados regularmente, se possível mais de uma vez ao dia, dependendo do protocolo de irradiação. Esses parâmetros incluem: curvatura, características dos pelos, perda de peso, diarreia, aparência do animal

(pele, olhos, mucosa), características relacionadas à respiração, comportamento em geral e provocado (mobilidade, ataxia) (KOCH *et al.*, 2016).

Dentre todos os critérios avaliados na tabela MISS, vale destacar o monitoramento do peso. No trabalho de Koch e colaboradores (2016), foi observado que o monitoramento do peso de forma sistemática, todos os dias, é um bom critério a ser utilizado, pois ajuda a prever de forma mais precisa o desfecho do animal, bem como intervenções precoces que venham garantir o seu bem-estar. Em contrapartida, Nunamaker e colaboradores (2013) mensuravam o peso uma vez por semana, e, apesar de ter sido observado um valor preditivo positivo de morte relacionada à variável perda de peso quando esta oscilava de 15-20%, o grande intervalo de monitoramento não contribuiu para a redução no número de animais que vieram a óbito. Desta forma, o monitoramento diário dos animais irradiados permite um refinamento dos dados, com intervenções precoces, que garantam a sobrevivência dos animais, bem como o estabelecimento de um novo critério de corte para perda de peso.

Os animais irradiados conseguem sobreviver mesmo com perda de peso de cerca de 20%, visto que a desidratação pós-irradiação já contribui com cerca de 10% da perda de peso. Animais com perda de peso acima de 20% podem recuperar o peso inicial entre 10 a 14 dias após o TMO (DURAN-STRUJCK; DYSKO, 2009). Além do monitoramento diário da perda de peso corporal, a temperatura corporal pode ser um fator preditivo de morte animal com sua diminuição de  $35 \pm 3^{\circ}\text{C}$  para  $29 \pm 6^{\circ}\text{C}$  (observada dentro de 1-2 dias antes do óbito ou eutanásia) (KOCH *et al.*, 2016).

Além do sistema MISS, há um outro sistema que combina os sinais clínicos com parâmetros laboratoriais, tais como contagem total de células do sangue periférico e o perfil de linhagens hematopoiéticas, além do perfil de expressão de proteínas responsivas à radiação (ligante de Flt-3, interleucina-6, fator estimulador de colônias de granulócitos G-CSF, trombopoietina, eritropoietina e amiloide A sérica) (OSSETROVA *et al.*, 2014; 2016).

Critérios histopatológicos também podem ser importantes instrumentos de análise, entretanto esse parâmetro não permite o acompanhamento do animal ao longo do experimento, pois necessita do estudo do órgão através de técnicas histológicas, o que requer a finalização do experimento e eutanásia do animal. Desta forma, outros sistemas de monitoramento que permitam o acompanhamento *in vivo* estão sendo cada vez mais utilizados. Em geral, esses sistemas utilizam marcadores fluorescentes como forma de acompanhamento, como, por exemplo, o monitoramento das células injetadas através de proteínas fluorescentes (REDDY *et al.*, 2008).

Na busca em aperfeiçoar o Sistema de Pontuação MISS 3 para o estudo de TMO, foram elencados outros critérios que compreendemos ser importantes para uma melhor acurácia e previsibilidade de morte iminente, disponibilizados na tabela 2 (Sistema de pontuação nas pesquisas com Irradiação e Transplante de Medula Óssea do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz).

**Dias de sobrevivência após a irradiação diária (100r/Dia)**

Linhagem	Fêmea	Macho	Fonte
	Tempo médio	Tempo médio	
129/J	33,03 (±8,58)	34,79 (±8,28)	Roderick, 1963
MA/J	31,50 (±4,93)	30,50 (±9,12)	Roderick, 1963
SJL/J	29,68 (±1,25)	30,45 (±1,97)	Roderick, 1963
SJL/J	28,05 (±0,50)		Yuhás; Storer, 1969
ST/J	29,83 (±4,82)	29,62 (±6,01)	Roderick, 1963
P/J	29,73 (±7,55)	26,23 (±9,18)	Roderick, 1963
C58/J	26,44 (±3,50)	29,52 (±6,68)	Roderick, 1963
MA/MyJ	28,76 (±6,82)	26,53 (±9,61)	Roderick, 1963
BDP/J	22,78 (±5,84)	30,86 (±5,23)	Roderick, 1963
C57L/J	22,84 (±1,77)	30,06 (±4,75)	Roderick, 1963
SWR/J	23,19 (±3,68)	26,38 (±6,17)	Roderick, 1963
SWR/J	25,23 (±0,64)		Yuhás; Storer, 1969
LP/J	23,17 (±5,96)	25,40 (±6,83)	Roderick, 1963
C57BR/cdJ	21,48 (±3,65)	26,65 (±6,61)	Roderick, 1963
C57BR/cdJ	22,40 (±0,70)		Yuhás; Storer, 1969
RF/J	22,88 (±4,79)	24,71 (±5,50)	Roderick, 1963
RF/J	23,15 (±0,80)		Yuhás; Storer, 1969
C57BL/6J	23,03 (±2,34)	24,58 (±5,76)	Roderick, 1963
C57BL/6J	23,90 (±0,50)		Yuhás; Storer, 1969
C57BL/10J	22,65 (±1,58)	24,27 (±4,43)	Roderick, 1963
C57BL/6JRk-c	21,31 (±3,37)	24,08 (±6,56)	Roderick, 1963
SM/J	21,57 (±2,59)	20,47 (±2,76)	Roderick, 1963
DBA/2J	19,41 (±4,69)	21,65 (±7,11)	Roderick, 1963
AKR/J	19,53 (±2,34)	20,59 (±4,37)	Roderick, 1963
A/J	18,84 (±2,85)	21,06 (±4,67)	Roderick, 1963
A/J	18,00 (±0,55)		Yuhás; Storer, 1969
DBA/1J	19,00 (±3,68)	20,64 (±6,03)	Roderick, 1963
A/HeJ	17,23 (±2,37)	19,93 (±2,91)	Roderick, 1963
C3HeB/FeJ	17,41 (±2,51)	18,52 (±3,12)	Roderick, 1963
C3HeB/FeJ	17,30 (±0,45)		Yuhás; Storer, 1969
RIII/AnJ	17,88 (±1,41)	18,00 (±1,91)	Roderick, 1963
C3H/HeJ	17,11 (±3,11)	17,96 (±2,87)	Roderick, 1963
BALB/cJ	16,76 (±2,56)	17,00 (±2,12)	Roderick, 1963
BALB/cJ	17,87 (±0,44)		Yuhás; Storer, 1969
CBA/J	16,55 (±2,60)	16,44 (±2,68)	Roderick, 1963
CBA/J	17,87 (±0,40)		Yuhás; Storer, 1969

Tabela 1: Tempo de resistência à radiação em diferentes linhagens murinas frente à irradiação diária (1Gy) de raios X. Dose: Yukas; Storer – 0,65 Gy/min; Roderick – 0,7 Gy/min.

<b>Sistema de Pontuação de Intervenção Murina Adaptado</b>		
<b>Perda de peso</b>	10-15%	0
	15-20%	3
	20-25%	6
	≥25%*	12
<b>Temperatura</b>	Normal	0
	Hipertermia	6
	Hipotermia*	12
<b>Frequência respiratória</b>	Respiração normal	0
	Respiração aumentada	6
	Respiração abdominal*	12
<b>Postura</b>	Normal	0
	Curvatura leve	3
	Curvatura moderada	6
	Curvatura grave*	12
<b>Abertura dos olhos</b>	Olhos abertos > 75%	0
	Olhos com abertura entre 50-75%	3
	Olhos com abertura entre 25-49%	6
	Olhos com abertura < 25%*	12
<b>Características dos Pelos</b>	Normal – liso e brilhante	0
	Opaco e áspero	3
	Ausência de limpeza e piloereção*	12
<b>Comportamento geral</b>	Mobilidade normal - ativo	0
	Mobilidade reduzida	3
	Ataxia, marcha vacilante	6
	Relutante em se movimentar	9
	Incapaz de se movimentar*	12
<b>Aparência geral</b>	Descarga ocular	3
	Palidez em pele e/ou mucosas	6
	Cianose em pele e/ou mucosas*	12
<b>Pontuação total</b>		
<b>Pontuação</b>		
<b>&lt; 12</b>	Normal	
<b>13–27</b>	Monitorar pelo menos 2 vezes ao dia	
<b>≥ 28</b>	Eutanásia imediatamente - ou qualquer critério único 12*	

Tabela 2: Sistema de pontuação para a finalização humanitária nas pesquisas com Irradiação e Transplante de Medula Óssea do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Tabela adaptada do Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (MISS 3) de Koch et al. (2016) e Nunamaker (2013).

## REFERÊNCIAS

- BUCHALI, A.; FEYER, P., GROLL, J.; MASSENKEIL, G.; ARNOLD, R.; BUDACH, V. Immediate toxicity during fractionated total body irradiation as conditioning for bone marrow transplantation. **Radiother Oncol.** v.54, p. 157–162, 2000.
- BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res** 13, 1–27, 1970.
- COOKE, K.; KOBZIK, L.; MARTIN, T. R.; BREWER, J.; DELMONTE, J.; CRAWFORD, J. M.; FERRARA, J. L. M. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. **Blood** 88, 3230–3239, 1996.
- COPELAN, E. A. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine** 354, 1813–1826, 2006.
- CUI, Y-Z; HISHA, H.; YANG, G-X.; FAN, T-X.; LI, Q.; LIAN, Z.; IKEHARA, S. Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice. **Bone Marrow Transplantation** 30, 843–849, 2002.
- DICARLO, A. L.; MAHER, C.; HICK, J. L.; HANFLING, D.; DAINIAK, N.; CHAO, N.; BADER, J. L.; COLEMAN, C. N.; WEINSTOCK, D. M. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. **Disaster Med Public Health** Prep 5 Suppl 1:S32–S44, 2011.
- DURAN-STRUUCK, R. & DYSKO, R. C. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** 48, 12, 2009.
- GOURDON, J.; JIMENEZ, A. **Post-Irradiation Care**. Comparative Medicine & Animal Resources Centre. SOP 615.03- UACC approved and effective date 09-12/2014. [https://www.mcgill.ca/research/files/research/615\\_-\\_post-irradiation\\_care\\_-\\_sept2015.pdf](https://www.mcgill.ca/research/files/research/615_-_post-irradiation_care_-_sept2015.pdf)
- HILL, G. R. & FERRARA, J. L. M. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** 95, 2754–2759, 2000.
- KOCH, A.; GULANI, J.; KING, G.; HIEBER, K.; CHAPPELL, M.; OSSETROVA, N. Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. **PLoS One**. Aug 31;11(8):e0161079, 2016.
- KUSHIDA, T.; INABA, M.; HISHA, H.; ICHIOKA, N.; ESUMI, T.; OGAWA, R.; IIDA, H.; IKEHARA, S. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. **Blood** 97, 3292–3299, 2001.
- LORENZ, E.; UPHOFF, D.; REID, T. R. & SHELTON, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **J Natl Cancer Inst** 12, 197–201, 1951.
- MORGAN, T. L.; FALK, P. M.; KOGUT, N.; SHAH, K. H.; TOME, M.; KAGAN, A. R. A comparison of single-dose and fractionated total-body irradiation on the development of pneumonitis following bone marrow transplantation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 36, 61–66, 1996.
- NASERIAN, S.; LECLERC, M.; THIOLAT, A.; PILON, C.; LE BRET, C.; BELKACEMI, Y.; MAURY, S.; CHARLOTTE, F.; COHEN, J. L. Simple, Reproducible, and Efficient Clinical Grading System for Murine Models of Acute Graft-versus-Host Disease. **Frontiers in Immunology** 9, 2018.

NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7, 2013.

OSSETROVA, N. I.; NEY, P. H.; CONDLIFFE, D. P.; KRASNOPOLSKY, K. & HIEBER, K. P. Acute Radiation Syndrome Severity Score System in Mouse Total-Body Irradiation Model. **Health Physics** 111, 134–144, 2016.

OSSETROVA, N. I.; SANDGREN, D. J. & BLAKELY, W. F. Protein biomarkers for enhancement of radiation dose and injury assessment in nonhuman primate total-body irradiation model. **Radiation Protection Dosimetry** 159, 61–76, 2014.

PIERCE, G. E.; WATTS, L. M. & CLANCY, J. Sublethal fractionated total-body irradiation and donor bone marrow infusion for induction of allograft tolerance. **Transplantation** 39, 236–241, 1985.

REDDY, P.; NEGRIN, R. & HILL, G. R. Mouse models of bone marrow transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 14, 129–135, 2008.

REKERS, P. E. Transplantation of Bone Marrow into Dogs That Have Received Total Body Single Dose Radiation. **University of Rochester Atomic Energy Project**, U. R. 11, 1948.

REKERS, P. E. Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. **Arch Surg** 60, 635, 1950.

RODERICK, T. H. The response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body x-irradiation. **Radiat res** 20, 631–639, 1963.

WASELENKO, J. K.; MACVITTIE, T. J.; BLAKELY, W. F.; PESIK, N.; WILEY, A. L.; DICKERSON, W. E.; TSU, H.; CONFER, D. L.; COLEMAN, C. N.; SEED, T.; LOWRY, P.; ARMITAGE, J. O.; DAINIAK, N. Strategic National Stockpile Radiation Working Group. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. **Annals of Internal Medicine** 140, 1037–1051, 2004.

YUHAS, J. M. & STORER, J. B. On mouse strain differences in radiation resistance: hematopoietic death and the endogenous colony-forming unit. **Radiat Res** 39, 608–622, 1969.